

УДК 630*165:630*44

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ ГЕНОВ *PINUS SYLVESTRIS*, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ФИТОПАТОГЕННЫМ МИКРОМИЦЕТАМ

Л. В. МОЖАРОВСКАЯ¹⁾

¹⁾Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, 246001, г. Гомель, Беларусь

На основе данных высокопроизводительного секвенирования транскриптов проростков сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) были отобраны локусы, характеризующиеся наибольшим уровнем экспрессионной активности. Последующий анализ полученных результатов в базе данных GenBank NCBI позволил идентифицировать семейства генов, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микроорганизмам: гликозилгидролазы (GH19), белков теплового шока Hsp70 и Hsp90, антимикробных полипептидов (AMP), кальцийсвязывающих белков (CBP); ингибиторов альфа-амилазы, липидтранспортующих белков, запасных белков семян (AAI-LTSS). Также были идентифицированы два EST-маркера с неустановленной функцией, характеризующиеся высоким уровнем сходства с последовательностями ранее описанных генов устойчивости *PsACRE* и полипептидов, обладающих антигрибковой активностью (SS/AF).

Ключевые слова: сосна обыкновенная; высокопроизводительное секвенирование; транскриптом; гены устойчивости; фитопатогенные организмы.

FUNCTIONAL ANNOTATION OF GENES OF *PINUS SYLVESTRIS* ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PHYTOPATHOGENIC MICROMYCETES

L. V. MOZHAROVSKAYA^a

^aInstitute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus, 71 Praletarskaja Street, Gomel 246001, Belarus

On the basis of the obtained data of next generation sequencing of Scots pine seedlings transcripts, high expressed loci were selected. Analysis of the results obtained in the GenBank NCBI database made it possible to identify families of genes associated with resistance to phytopathogenic microorganisms: glycosylhydrolase (GH19), heat shock proteins Hsp70 and Hsp90, antimicrobial polypeptides (AMP), calcium-binding proteins (CBP); alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins, seed storage proteins (AAI-LTSS). Also, two EST markers with an unidentified function were identified, characterized by a high degree of similarity to the sequences of the previously described resistance genes *PsACRE* and polypeptides having antifungal activity (SS/AF).

Key words: scotch pine; next-generation sequencing; transcriptome; resistance genes; phytopathogenic organisms.

Образец цитирования:

Можаровская ЛВ. Функциональная аннотация генов *Pinus sylvestris*, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микромицетам. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018;2:78–84.

For citation:

Mozharovskaya LV. Functional annotation of genes of *Pinus sylvestris* associated with resistance to phytopathogenic micro-mycetes. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2018;2:78–84 (in Russ.).

Автор:

Людмила Валентиновна Можаровская – младший научный сотрудник сектора геномных исследований лаборатории генетики и биотехнологии.

Author:

Ludmila V. Mozharovskaya, junior researcher at the section of genomic research, laboratory of genetics and biotechnology. milamozh@yandex.ru

Введение

Среди биотических факторов, оказывающих негативное влияние на морфометрические и физиологические показатели посадочного материала сосны обыкновенной, выращиваемого в лесных питомниках, инфекционные болезни имеют первостепенное значение. Согласно литературным данным возбудителями фитозаболеваний в подавляющем большинстве выступают грибные организмы, реже – бактерии и вирусы [1].

Для противодействия патогенной инвазии у растений в ходе эволюции была сформирована сложная многоуровневая система защитных механизмов, индуцируемая посредством различных макромолекул белковой природы: внутриклеточных рецепторов (продукты *R*-генов (генов устойчивости)), распознающих эффекторных молекул паразита (продукты *Avr*-генов (генов авирулентности)); ферментов, связанных с образованием сигнальных молекул (жасмоновой кислоты, салициловой кислоты, этилена и др.), а также полипептидов, ассоциированных с процессами патогенеза (*PR*-белки) [2–4]. Эффективность реализации защитных механизмов, как правило, определяется способностью к регуляции растительным организмом экспрессионной активности генов, детерминирующих ответные реакции по отношению к фитопатогенным микроорганизмам.

Несмотря на наличие большого числа научных публикаций, посвященных изучению молекулярно-генетических механизмов устойчивости древесных растений к различным фитопатогенным микромикробам, применительно к хвойным видам большинство исследований связано с фрагментарным изучением отдельных локусов на постувеличных стадиях. Кроме того, представленные результаты часто носят разрозненный или противоречивый характер, что не позволяет сформировать единую концепцию и методологические подходы для анализа наследуемых факторов резистентности по отношению к патогенным грибам у видов рода *Pinus*.

Среди имеющихся работ, связанных с анализом генов, детерминирующих признак устойчивости у хвойных растений, можно выделить исследования Ж. Лю с соавторами и Б. Мейерса с соавторами [4; 5]. Указанными авторами на основе известных *R*-генов травянистых растений, относящихся к суперсемействам, детерминирующих полипептиды, содержащие функциональные нуклеотидсвязывающие (NBS) домены и С-концевые лейциннасыщенные повторы (LRR), идентифицированы их аналоги для *Pinus monticola* и *P. taeda*.

Не менее важными маркерами, характеризующими этапы инфекционного процесса и механизмы устойчивости, являются локусы, ассоциированные с патогенетическими реакциями. В целом по результатам проведенных молекулярно-генетических исследований среди *PR*-генов хвойных растений в наибольшей степени охарактеризованы: локусы, кодирующие литические ферменты, такие как β -1,3-глюканазы (семейство *PR*-2) и хитиназы (семейства *PR*-3, -4, -8, -11), участвующие в деградации клеточных стенок грибных микроорганизмов; тауматинподобные белки (семейство *PR*-5); группа ферментов пероксидаз лигнинообразующего типа, ассоциированных с формированием клеточной стенки (семейство *PR*-9); рибонуклеазы (семейство *PR*-10); растительные дефензины (семейство *PR*-12) [6].

Среди регуляторных механизмов для хвойных видов описаны сигнальные системы, основанные на секреции различных растительных гормонов: жасмонатов, салицилатов, фенилпропаноидов, что, в свою очередь, делает перспективным поиск локусов, связанных с метаболизмом данных соединений [7].

К настоящему времени в GenBank NCBI представлены только первичные данные секвенирования (WGS) сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) (автор К. Доннелли; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/FRDG00000000.1>) без проведения структурно-функциональной аннотации, что не позволяет напрямую применить указанные данные для выявления генов, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенам.

Цель данной работы – с помощью подходов сравнительной геномики выявить и идентифицировать в транскриптоме проростков сосны обыкновенной экспрессирующиеся гены, ассоциированные с устойчивостью к фитопатогенным микромикробам.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований являлись проростки *P. sylvestris* ($n = 14$), выращенные в лабораторных условиях при температуре воздуха 22 °C и фотопериоде 10 ч в течение 14 сут.

Выделение тотальной РНК проводили из корня и гипокоты проростков сосны обыкновенной с помощью набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (*Thermo Scientific*, США) по методике фирмы-производителя. Для очистки РНК от примесей геномной ДНК использовали набор DNase I (RNase-free) (*Thermo Scientific*, США), а для ингибирования рибонуклеаз – RNase Inhibitor (*Thermo Scientific*, США). Реакцию обратной транскрипции выполняли для матричной РНК (применяли праймер Oligo(dT)18) с получением двухцепочечной кДНК (набор Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit; *Thermo*

Scientific, США). Двухцепочечную кДНК очищали от сторонних примесей с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (*Beckman Coulter*, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

Создание библиотек кДНК (ожидаемый размер фрагмента ≈ 200 п. н.) выполняли с помощью набора Ion Plus Fragment Library Kit (*Thermo Scientific*, США). Эмульсионную ПЦР проводили с использованием набора Ion PGM Template OT2 200 Kit (*Thermo Scientific*, США) согласно инструкции компании-производителя в планшетном амплификаторе Ion One Touch 2 System (*Thermo Scientific*, США). На этапе обогащения микросфер применяли автоматическую пробоподготовку Ion OneTouch ES и наборы Ion PGM Template OT2 Solutions 200 Kit и Ion PGM Enrichment Beads (*Thermo Scientific*, США). Реакцию секвенирования выполняли на основе платформы для секвенирования Ion PGM System и набора Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 (*Thermo Scientific*, США) с использованием полупроводникового микрочипа Ion 314 Chip v2 (*Thermo Scientific*, США). Данные, поступающие от геномного анализатора, первоначально обрабатывали в автоматическом режиме при помощи программного обеспечения *Ion Torrent Suite* (*Thermo Scientific*, США).

Окончательную обработку информации и сборку транскриптов генов производили с использованием программного обеспечения *SeqMan Ngen v. 12* (*DNASTAR*, Израиль).

Результаты исследования и их обсуждение

На основании высокопроизводительного секвенирования библиотек кДНК проростков сосны обыкновенной с последующей сборкой первичных последовательностей (ридов) получено более 28 тыс. компилированных фрагментов (контигов), из которых было отобрано 150 с наибольшим значением параметра уровня покрытия, превышающим общеусредненный показатель в 20–130 раз. С использованием ISS-подхода (анализ сходства последовательностей) в базе данных нуклеотидных последовательностей и консервативных доменов GenBank NCBI идентифицирован перечень генов, ассоциированных с устойчивостью к инфекционным заболеваниям семян сосны обыкновенной. Перечень локусов представлен в таблице. Расположение EST-маркеров соответствует порядку убывания экспрессионной активности.

EST-локусы, ассоциированные с устойчивостью
к инфекционным заболеваниям семян сосны обыкновенной
EST-loci associated with resistance to infectious diseases of Scots pine seedlings

Идентификационный номер контига	Структурно-функциональная принадлежность
19	Ген устойчивости <i>PsACRE</i>
11, 33	Ген, кодирующий белок с антигрибковой активностью (SS/AF)
45, 43	Ген антимикробного белка 1 (PpAMP1)
134	Ген, кодирующий белок дефензин (Def)
44	Ген антимикробного белка 4 (Sp-AMP4)
316, 196	Ген, кодирующий белок семейства AAI-LTSS
177	Ген, кодирующий хитиназу (GH19)
388	Ген, кодирующий белок-шаперон Hsp70
370	Ген, кодирующий белок кальмодулин (CaM)
944	Ген, кодирующий белок-шаперон Hsp90

Как следует из таблицы, среди идентифицированных генов наибольший уровень экспрессии отмечен у белоккодирующей последовательности (контиг № 19), характеризующейся 99 % степенью сходства с геном устойчивости *PsACRE P. sylvestris* (депонент GenBank AY423270.1), содержащим регион, детерминирующий лейциннасыщенные повторы (LRR) [8]. Последние являются составляющими элементами рецепторных белков, осуществляющих распознавание эффекторных белков патогенов [9]. Поиск в базе консервативных доменов CDD (Conservative Domain Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) выявил в составе контига № 19 наличие домена DUF761 с неустановленной функцией. Согласно литературным данным аналогичный домен у растительных организмов обнаружен в составе структурных белков CFE, экспрессирующихся в клетках волокон хлопчатника *Gossypium hirsutum* [10].

Среди последовательностей, относящихся к R-генам, в транскриптах проростков *P. sylvestris* идентифицированы локусы полипептидов, характеризующиеся антигрибковой активностью (SS/AF). Так, контиги № 11, 33 содержали белковый домен PF01657, ассоциированный с реакцией на солевой

стресс и обладающий фунгицидными свойствами. Структурно-функциональные свойства домена в литературе детально описаны для *Ginkgo biloba* [11; 12]. Структурной особенностью домена является наличие 6 консервативных цистеинов, связанных дисульфидными мостиками. Как правило, домен PF01657 представлен в комплексе с киназными доменами и зачастую дублируется в полипептидной цепи.

Проведенный анализ нуклеотидной структуры контигов № 45, 43, 134, 44 выявил их высокий уровень сходства с генами цистеиннасыщенных защитных антимикробных полипептидов (AMP). Эти белки характеризуются небольшим размером (менее 100 аминокислот) и на основе гомологии аминокислотных последовательностей, а также пространственной структуры классифицируются на следующие семейства: тионины, дефензины, хитинподобные белки, гевеино-нотииноподобные белки, неспецифические липидпереносящие белки (ЛПБ), макроциклические пептиды [13–15]. Контиги № 45, 43 и № 44 содержали домен MiAMP1 (один и два соответственно), описанный для антимикробного белка ореха *Macadamia integrifolia* [16]. Нуклеотидная последовательность контигов № 45, 43 была сходной на 97 % с последовательностью гена антимикробного белка 1 (PrAMP1) *Pinus pinaster* (депонент GenBank HM210085) [15]. Контиг № 44 на 98 % совпадал с последовательностью гена антимикробного пептида 4 (AMP4) семейства белков Sp-AMP *P. sylvestris* (депонент GenBank AF410955) [17]. Контиг № 134 на основании анализа доменов был идентифицирован как дефензин. Дефензины представляют собой низкомолекулярные цистеиннасыщенные полипептиды с антимикробными свойствами (AMP). Как правило, дефензины состоят из 45–54 аминокислотных остатков с постоянной структурой цистеинов, которые связаны четырьмя дисульфидными мостиками. Степень сходства данного контига с последовательностью гена дефензина *PsDef2 P. sylvestris* (депонент GenBank EF455617.1) составила 94 % [18]. Растительные дефензины относятся к группе PR-12 патогенезассоциированных белков с выраженной бактерицидной активностью. Согласно литературным данным большинство из них участвуют в формировании защитных реакций при холодовом стрессе, засухе, а также засолении [19–21].

Среди генов, ассоциированных с процессами патогенеза, нами были аннотированы гены (контиги № 316, 196), кодирующие белки, содержащие функциональные домены семейства AAI-LTSS. Данный домен у высших растений встречается в полипептидах разных групп, включая ингибиторы альфа-амилазы (AAI), липидтранспортующие белки (LT), запасные белки семян (SS) и др. Функциональные свойства домена AAI-LTSS связаны с защитными реакциями растений по отношению к насекомым и патогенам, переносом липидных молекул между внутриклеточными мембранами, а также с процессами роста и развития [22].

Контиг № 177 был аннотирован нами как ген гидролитического фермента хитиназы, относящейся к семейству 19 гликозилгидролаз (GH19) и катализирующей деградацию хитина посредством разрушения β -1,4-гликозидных связей N-ацетил-D-глюкозамина [23; 24].

Хитиназы растений относятся к группам (PR-3, -4, -8, -11) белков, ассоциированных с патогенезом, и представляют собой важный фактор резистентности по отношению к воздействию фитопатогенных микромицетов: защитная функция растительных хитиназ была продемонстрирована в значительном числе исследований. Например, в работе [25] у инфицированных *Fusarium spp.* проростков *P. elliotii* было показано индуцирование хитиназной активностью биосинтеза салициловой (для хитиназ I, II и IV классов) и жасмоновой кислот (для хитиназ I и IV классов), что указывает на основополагающую роль данного фермента в развитии системной устойчивости семян сосны.

Также в ходе исследования нами было идентифицировано два семейства белков теплового шока (белков-шаперонов) Hsp70 и Hsp90 (контиги № 388 и 944 соответственно). Согласно литературным данным белки семейства Hsp70 предотвращают межмолекулярную агрегацию полипептидов, участвуют в поддержании третичной структуры различных структурных и функциональных белков в условиях абиотического и биотического стресса. Кроме того, для них показана важная роль в процессах транслокации и транспорта белков [26]. Защитная функция белков Hsp70 продемонстрирована на примере инфицированных бактерией *Pseudomonas cichorii* растений *Nicotiana benthamiana* – как составляющий элемент сигнальной трансдукции формирования реакции сверхчувствительности [27]. Белок Hsp90 участвует в фолдинге, регулирует созревание и активацию многочисленных белков сигнальной трансдукции, клеточного цикла и транскрипции [28]. Описаны механизмы защиты растений от патогенов с участием Hsp90 и связанного с ним комплекса белков-кошаперонов: SGT1, RAR1, NLR [29; 30].

Контиг № 370 был функционально аннотирован как ген (*CaM*) кальмодулина – небольшого белка (16,7 кДа), обладающего кальцийсвязывающей активностью. Согласно исследованиям различных авторов при повышении уровня Ca^{2+} в растительной клетке происходит его хелатирование CaM-белком, что приводит к формированию модулирующего комплекса, оказывающего влияние на активность различных клеточных белков. Данный механизм лежит в основе большого числа ответных физиологических клеточных реакций на изменения условий окружающей среды. По существующим в настоящее

время данным, у растительных организмов выявлено более 50 типов белков, имеющих сайт связывания с кальмодулином [31]. В работе [32] описан механизм регуляции кальмодулином системной приобретенной устойчивости салицилатного типа у мутантной и контрольной линий *Arabidopsis thaliana*. У мутантных растений с деактивированным геном *AtSRI* было показано повышение уровня салициловой кислоты, что указывает на отрицательное влияние экспрессии гена *AtSRI* на устойчивость растений.

На основании полученных данных в целях проведения дальнейшего детального исследования устойчивости проростков сосны обыкновенной к фитопатогенным микроорганизмам был сформирован набор из 10 пар праймеров для скрининга и количественной оценки уровня экспрессии генов, ассоциированных с устойчивостью к инфекционным заболеваниям.

Заключение

В результате проведенных исследований для транскриптома проростков сосны обыкновенной идентифицировано 10 генов, ассоциированных с устойчивостью к инфекционным заболеваниям. На основе полученных данных разработан набор праймеров для проведения скрининга и анализа уровня экспрессии выявленных локусов.

Библиографические ссылки

1. Федоров НИ. Лесная фитопатология. Минск: БГТУ; 2004.
2. McDowell JM, Woffenden BJ. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(4):178–183. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00053-2.
3. Dong X, SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current opinion in plant biology*. 1998;1(4):316–323. DOI: 10.1016/S1369-5266(88)80053-0.
4. Liu JJ, Ekramoddoullah AKM. Isolation, genetic variation and expression of *TIR-NBS-LRR* resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Molecular Genetics and Genomics*. 2004;270(5):432–441. DOI: 10.1007/s00438-003-0940-1.
5. Meyers BC, Morgante M, Michelmore RW. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. *The Plant Journal*. 2002;32(1):77–92. DOI: 10.1046/j.1365-3113X.2002.01404.x.
6. Bonello P, Gordon TR, Herms DA. Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: a novel hypothesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2006;68(4–6):95–104. DOI: 10.1016/j.pmp.2006.12.002.
7. Davis JM, Wu H, Cooke JE. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Molecular plant-microbe interactions*. 2002;15(4):380–387. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.4.380.
8. Li G, Asiegbu FO. Induction of *Pinus sylvestris* *PsACRE*, a homology of *Avr9/Cf-9* rapidly elicited defense-related gene following infection with root rot fungus *Heterobasidion annosum*. *Plant science*. 2004;167(3):535–540. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.04.025.
9. Ellis JG, Dodds PN, Lawrence GJ. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 2007;45:289–306. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094331.
10. Yamamoto E, Baird WV. Three cotton fiber-expressed cDNAs (Accession Nos. AF072404, AF072405, and AF072406) (PGR 98–144). *Plant Physiology*. 1998;117(4):1525–1528. DOI: 10.1104/pp.117.4.1525.
11. Zhang L, Tian LH, Zhao JF. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*. 2009;149(2):916–928. DOI: 10.1104/pp.108.131144.
12. Sawano Y, Miyakawa T, Yamazaki H. Purification, characterization, and molecular gene cloning of an antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds. *Biological chemistry*. 2007;388(3):273–280. DOI: 10.1515/BC.2007.030.
13. Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM. Plant defense peptides. *Peptide Science*. 1998;47(6):479–491. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K.
14. Tam JP, Wang S, Wong KH. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*. 2015;8(4):711–757. DOI: 10.3390/ph8040711.
15. Canales J, Avila C, Canovas FM. A maritime pine antimicrobial peptide involved in ammonium nutrition. *Plant, cell and environment*. 2011;34(9):1443–1453. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02343.x.
16. McManus AM, Nielsen KJ, Marcus JP. MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a greek key β -barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins 1. *Journal of molecular biology*. 1999;293(3):629–638. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3163.
17. Asiegbu FO, Choi W, Li G. Isolation of a novel antimicrobial peptide gene (*Sp-AMP*) homologue from *Pinus sylvestris* (Scots pine) following infection with the root rot fungus *Heterobasidion annosum*. *FEMS microbiology letters*. 2003;228(1):27–31. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00697-9.
18. Kovalyova VA, Gout RT. Molecular cloning and characterization of Scotch pine defending 2. *Cytology and genetics*. 2008;42(6):408–412. DOI: 10.3103/S0095452708060091.
19. Do HM, Lee SC, Jung HW, Hwang BK. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEFI*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science*. 2004;166(5):1297–1305. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.01.008.
20. Lacerda A, Vasconcelos EAR, Pelegrini PB. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:116. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00116.
21. Gaudet DA, Laroche A, Frick M. Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiologia Plantarum*. 2003;117(2):195–205. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00041.x.

22. Simoes M, Rodrigues A, de Vega Bartol J. Molecular characterization of pine embryogenesis: pursuing the role of a putative non-specific lipid-transfer protein. *BioMed Central*. 2011;5(7):71. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S7-P71.
23. Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012;31(1):57–73. DOI: 10.1080/07352689.2011.616043.
24. Salzer P, Bonanomi A, Beyer K. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2000;13(7):763–777. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.7.763.
25. Davis JM, Wu H, Cooke JE. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Molecular plant-microbe interactions*. 2002;15(4):380–387. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.4.380.
26. Wang W, Vinocur B, Shoseyov O. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*. 2004;9(5):244–252. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.03.006.
27. Kanzaki H, Saitoh H, Ito A. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular plant pathology*. 2003;4(5):383–391. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00186.x.
28. Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones*. 2001;6(3):238–246. DOI: 10.1379/1466-1268(2001)006<0238:THFOPI>2.0.CO;2.
29. Breiman A. Plant Hsp90 and its co-chaperones. *Current Protein and Peptide Science*. 2014;15(3):232–244.
30. Takahashi A, Casais C, Ichimura K. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(20):11777–11782. DOI: 10.1073/pnas.2033934100.
31. AL-Quraan NA, Locy RD, Singh NK. Expression of calmodulin genes in wild type and calmodulin mutants of *Arabidopsis thaliana* under heat stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010;48(8):697–702. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.04.011.
32. Du L, Ali GS, Simons KA. Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*. 2009;457(7233):154–1158. DOI: 10.1038/nature07612.

References

1. Fedorov NI. *Lesnaya fitopatologiya* [Forest Phytopathology]. Minsk: BG TU; 2004 (in Russ.).
2. McDowell JM, Woffenden BJ. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(4):178–183. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00053-2.
3. Dong X, SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current opinion in plant biology*. 1998;1(4):316–323. DOI: 10.1016/S1369-5266(88)80053-0.
4. Liu JJ, Ekramoddoullah AKM. Isolation, genetic variation and expression of *TIR-NBS-LRR* resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Molecular Genetics and Genomics*. 2004;270(5):432–441. DOI: 10.1007/s00438-003-0940-1.
5. Meyers BC, Morgante M, Michelmore RW. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *The Plant Journal*. 2002;32(1):77–92. DOI: 10.1046/j.1365-3113X.2002.01404.x.
6. Bonello P, Gordon TR, Herms DA. Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: a novel hypothesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2006;68(4–6):95–104. DOI: 10.1016/j.pmpp.2006.12.002.
7. Davis JM, Wu H, Cooke JE. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Molecular plant-microbe interactions*. 2002;15(4):380–387. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.4.380.
8. Li G, Asiegbu FO. Induction of *Pinus sylvestris* *PsACRE*, a homology of *Avr9/Cf-9* rapidly elicited defense-related gene following infection with root rot fungus *Heterobasidion annosum*. *Plant science*. 2004;167(3):535–540. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.04.025.
9. Ellis JG, Dodds PN, Lawrence GJ. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 2007;45:289–306. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094331.
10. Yamamoto E, Baird WV. Three cotton fiber-expressed cDNAs (Accession Nos. AF072404, AF072405, and AF072406) (PGR 98–144). *Plant Physiology*. 1998;117(4):1525–1528. DOI: 10.1104/pp.117.4.1525.
11. Zhang L, Tian LH, Zhao JF. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*. 2009;149(2):916–928. DOI: 10.1104/pp.108.131144.
12. Sawano Y, Miyakawa T, Yamazaki H. Purification, characterization, and molecular gene cloning of an antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds. *Biological chemistry*. 2007;388(3):273–280. DOI: 10.1515/BC.2007.030.
13. Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM. Plant defense peptides. *Peptide Science*. 1998;47(6):479–491. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K.
14. Tam JP, Wang S, Wong KH. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*. 2015;8(4):711–757. DOI: 10.3390/ph8040711.
15. Canales J, Avila C, Canovas FM. A maritime pine antimicrobial peptide involved in ammonium nutrition. *Plant, cell and environment*. 2011;34(9):1443–1453. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02343.x.
16. McManus AM, Nielsen KJ, Marcus JP. MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a greek key β -barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins 1. *Journal of molecular biology*. 1999;293(3):629–638. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3163.
17. Asiegbu FO, Choi W, Li G. Isolation of a novel antimicrobial peptide gene (*Sp-AMP*) homologue from *Pinus sylvestris* (Scots pine) by two-dimensional infection with the root rot fungus *Heterobasidion annosum*. *FEMS microbiology letters*. 2003;228(1):27–31. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00697-9.
18. Kovalyova VA, Gout RT. Molecular cloning and characterization of Scotch pine defending 2. *Cytology and genetics*. 2008;42(6):408–412. DOI: 10.3103/S0095452708060091.
19. Do HM, Lee SC, Jung HW, Hwang BK. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEFI*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science*. 2004;166(5):1297–1305. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.01.008.

20. Lacerda A, Vasconcelos EAR, Pelegri PB. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:116. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00116.
21. Gaudet DA, Laroche A, Frick M. Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiologia Plantarum*. 2003;117(2):195–205. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00041.x.
22. Simoes M, Rodrigues A, de Vega Bartol J. Molecular characterization of pine embryogenesis: pursuing the role of a putative non-specific lipid-transfer protein. *BioMed Central*. 2011;5(7):71. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S7-P71.
23. Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012;31(1):57–73. DOI: 10.1080/07352689.2011.616043.
24. Salzer P, Bonanomi A, Beyer K. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2000;13(7):763–777. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.7.763.
25. Davis JM, Wu H, Cooke JE. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Molecular plant-microbe interactions*. 2002;15(4):380–387. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.4.380.
26. Wang W, Vinocur B, Shoseyov O. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*. 2004;9(5):244–252. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.03.006.
27. Kanzaki H, Saitoh H, Ito A. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular plant pathology*. 2003;4(5):383–391. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00186.x.
28. Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones*. 2001;6(3):238–246. DOI: 10.1379/1466-1268(2001)006<0238:THFOPI>2.0.CO;2.
29. Breiman A. Plant Hsp90 and its co-chaperones. *Current Protein and Peptide Science*. 2014;15(3):232–244.
30. Takahashi A, Casais C, Ichimura K. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(20):11777–11782. DOI: 10.1073/pnas.2033934100.
31. AL-Quraan NA, Locy RD, Singh NK. Expression of calmodulin genes in wild type and calmodulin mutants of *Arabidopsis thaliana* under heat stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010;48(8):697–702. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.04.011.
32. Du L, Ali GS, Simons KA. Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*. 2009;457(7233):154–1158. DOI: 10.1038/nature07612.

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.